

L2 ANSWER 1 OF 6 WPIX (C) 2002 THOMSON DERWENT
 AN 2002-509021 [54] WPIX Full-text
 DNN N2002-402824 DNC C2002-144806
 TI New nucleic acid that binds to guanine nucleotide exchange factor, useful
 for treating e.g. metastatic lymphoma, and also in drug screening.
 DC B04 D16 P14
 IN BLIND, M; FAMULOK, M; KOLANUS, W; MAYER, G
 PA (NASC-N) NASCATELL GMBH
 CYC 101
 PI WO 2002053731 A1 20020711 (200254)* DE 77p C12N015-10
 RW: AT BE CH CY DE DK EA ES FI FR GB GH GM GR IE IT KE LS LU MC MW MZ
 NL OA PT SD SE SL SZ TR TZ UG ZM ZW
 W: AE AG AL AM AT AU AZ BA BB BG BR BY BZ CA CH CN CO CR CU CZ DE DK
 DM DZ EC EE ES FI GB GD GE GH GM HR HU ID IL IN IS JP KE KG KP KR
 KZ LC LK LR LS LT LU LV MA MD MG MK MN MW MX MZ NO NZ OM PH PL PT
 RO RU SD SE SG SI SK SL TJ TM TN TR TT TZ UA UG US UZ VN YU ZA ZM
 ZW
 EP 1223216 A1 20020717 (200255) DE C12N015-11
 R: AL AT BE CH CY DE DK ES FI FR GB GR IE IT LI LT LU LV MC MK NL PT
 RO SE SI TR
 ADT WO 2002053731 A1 WO 2001-EP15377 20011229; EP 1223216 A1 EP 2000-128766
 20001230
 PRAI EP 2000-128766 20001230
 IC ICM C12N015-10; C12N015-11
 ICS A01K067-00; A61K031-7088; A61K048-00; C12N005-10; C12N015-63;
 C12Q001-68; G01N033-53
 AB WO 2002053731 A UPAB: 20020823
 NOVELTY - A nucleic acid (I), especially isolated, that binds to a guanine
 nucleotide exchange factor (GNEF) for ADP (adenosine diphosphate)- ribosylation
 factors (ARF), or their derivatives, is new.
 DETAILED DESCRIPTION - INDEPENDENT CLAIMS are also included for the following:
 (1) vectors, especially expression vectors, that contain (I); (2) cells
 containing (I) and/or the vector of (1); (3) animals, preferably transgenic,
 containing a cell of (2); (4) inhibitors (II) of small (especially not over 50
 KD) GNEF for ARF;
 (5) screening for compounds (III) that inhibit interaction between GNEF and (I);
 and
 (6) identifying an isolated nucleic acid that binds to GNEF, especially one for
 ARF.
 ACTIVITY - Cytostatic; Immunosuppressive; Antiinflammatory; Vasotropic. No
 biological data is given.
 MECHANISM OF ACTION - Exchange of GDP for GTP (guanosine di- or tri-phosphate)
 inhibitor; ARFs activation inhibitor, Adhesion of immune cells mediated by beta
 2-integrin reducer. About 50 % of Jurkat E6 cells transformed with a vector
 expressing a 94 base pair aptamer (sequence given in the specification) that had
 been selected for binding to cytohesin-1, were able to bind to intracellular
 adhesion molecule-1. When the cells were activated with phorbol myristate-acetate
 (PMA), the proportion of adherent cells increased only slightly (to about 55 %),
 compared to cells transfected with an empty virus, where adhesion increased from
 about 55 % to 100 % in the presence of PMA.
 USE - (I), also vectors and cells containing it, are used: (i) for treatment of
 metastatic lymphoma and melanoma, autoimmune diseases, acute and chronic
 inflammation, reperfusion injury and transplantation-related diseases (e.g. graft
 rejection and graft versus host disease), particularly in gene therapy; and (ii)
 for detecting and complexing GNEF. (I) can also be used to:
 (i) screen for compounds (III) that inhibit interaction of (I) with GNEF, where
 (III) are potential therapeutic agents; and (ii) particularly when complexed with
 GNEF, for rational design of low molecular weight inhibitors.
 Dwg.0/12
 FA AB; DCN
 MC CPI: B04-B03C; B04-E01; B04-E08; B04-F0100E; B04-P0100E; B11-C08E;
 B12-K04E; B14-C03; B14-F05; B14-G02C; B14-G02D; B14-H01; B14-L06;
 B14-S03; D05-H09; D05-H12; D05-H12D5; D05-H12E; D05-H14; D05-H16A

Patent [19]

[11] Patent Number: WO2002053731

[45] Date of Patent: Jul. 11, 2002

[54] INTRACELLULAR NUCLEIC ACID INHIBITORS OF SMALL GUANINE NUCLEOTIDE EXCHANGE FACTORS

[75] Inventor(s): **KOLANUS; Waldemar** Gosswinstrasse 7, 81245 München DE DE DE
FAMULOK; Michael Leonardusstrasse 26, 53175 Bonn DE DE DE
BLIND; Michael Seinsheimstrasse 11, 81245 München DE DE DE
MAYER; Günter Fürstenriederstrasse 89, 80686 München DE DE DE

[21] Appl. No.: EP0115377 EP

[22] Filed: Dec. 29, 2001

[73] Assignee: **NASCACELL GMBH**; Bahnhofstrasse 9 - 15 82327 Tutzing DE DE DE

[30] Foreign Application Priority Data:
EP Dec. 30, 2000 00128766

[51] Int. Cl.⁶ C12N01511

[51] Int. Cl.⁶ C12Q00168

[51] Int. Cl.⁶ C12N01563

[51] Int. Cl.⁶ C12N00510

[51] Int. Cl.⁶ A01K06700

[51] Int. Cl.⁶ A61K0317088 *Attorney, Agent, or Firm - Legal firm - BOHMANN, Armin, K.*

[57] **ABSTRACT**

The invention relates to a nucleic acid, especially an isolated nucleic acid, that is capable of binding to a guanine nucleotide exchange factor for ADP ribosylation factors, and to the derivatives thereof.

GEF

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum
11. Juli 2002 (11.07.2002)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 02/053731 A1

(51) Internationale Patentklassifikation⁷: C12N 15/10, 15/11, C12Q 1/68, C12N 15/63, 5/10, A01K 67/00, A61K 31/7088

(81) Bestimmungsstaaten (national): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP01/15377

(84) Bestimmungsstaaten (regional): ARIPO-Patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI-Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

(22) Internationales Anmeldedatum: 29. Dezember 2001 (29.12.2001)

Veröffentlicht:

- mit internationalem Recherchenbericht
- vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche geltenden Frist; Veröffentlichung wird wiederholt, falls Änderungen eintreffen

(25) Einreichungssprache: Deutsch

(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch

(30) Angaben zur Priorität:
00128766.3 30. Dezember 2000 (30.12.2000) EP

(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme von US): NASCACELL GMBH [DE/DE]; Bahnhofstrasse 9-15, 82327 Tutzing (DE).

(72) Erfinder; und

(75) Erfinder/Anmelder (nur für US): KOLANUS, Waldemar [DE/DE]; Gosswinstrasse 7, 81245 München (DE). FAMULOK, Michael [DE/DE]; Leonardsstrasse 26, 53175 Bonn (DE). BLIND, Michael [DE/DE]; Seinsheimstrasse 11, 81245 München (DE). MAYER, Günter [DE/DE]; Fürstenriederstrasse 89, 80686 München (DE).

(74) Anwalt: BOHMANN, Armin, K.; Bohmann & Loosen, Sonnenstrasse 8, 80331 München (DE).

Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes und der anderen Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe der PCT-Gazette verwiesen.



WO 02/053731 A1

(54) Title: INTRACELLULAR NUCLEIC ACID INHIBITORS OF SMALL GUANINE NUCLEOTIDE EXCHANGE FACTORS

(54) Bezeichnung: INTRAZELLULÄRE NUKLEINSÄUREINHIBITOREN KLEINER GUANINNUCLEOTID-AUSTAUSCHFAKTOREN

(57) Abstract: The invention relates to a nucleic acid, especially an isolated nucleic acid, that is capable of binding to a guanine nucleotide exchange factor for ADP ribosylation factors, and to the derivatives thereof.

(57) Zusammenfassung: Die vorliegend Erfindung betrifft eine Nukleinsäure, insbesondere eine isolierte Nukleinsäure, die in der Lage ist, an einen Guaninnukleotid-Austauschfaktor für ADP-Ribosylierungsfaktoren zu binden, und deren Derivate.

Intrazelluläre Nukleinsäureinhibitoren kleiner Guaninnukleotid-Austauschfaktoren

Die vorliegende Erfindung betrifft Nukleinsäuren, die in der Lage sind, an einen Guaninaustauschfaktor zu binden, diese enthaltende Vektoren, diese enthaltende Zellen, Verwendungen derselben, diese enthaltende Zusammensetzungen, Inhibitoren für einen Guaninaustauschfaktor und Verfahren zum Screenen von Verbindungen, die die Wechselwirkung zwischen einem Guaninnukleotidaustauschfaktor und einer Nukleinsäure inhibieren.

Proteine der Familie der Guaninnukleotid-Austauschfaktoren (ARF-GEF's) für humane ADP-Ribosylierungsfaktoren (ARF's), die hierin auch als ARF-GEF's bezeichnet werden, wobei die ARF's wiederum kleine ras-ähnliche GTPasen sind, spielen eine kritische Rolle beim Transport intrazellulärer Vesikel und der Organisation des Aktinzytoskeletts. ARF's gehören zu einer großen Familie von monomeren G-Proteinen, die an einer Vielzahl von Signaltransduktionskaskaden und regulatorischen Prozessen beteiligt sind. Die ARF-Proteine von Säugern können in drei Klassen unterteilt werden: Klasse I (ARF 1, 2, 3), Klasse II (ARF 4 und 5) und Klasse III (ARF 6). ARF's interagieren mit einer Reihe regulatorischer Proteine (ARF-GEF's, GTPase aktivierende Proteine (GAPs), Arfaptine), Effektorproteinen (Coatomer, Phospholipase D, $\beta\gamma$ -Untereinheiten von G-Proteinen), Choleratoxin, und Phospholipiden. Die Aktivität der ARF-Proteine wird durch die Art des gebundenen Nukleotidkofaktors bestimmt. GEF's, die die Freisetzung von gebundenen GDP und damit die Bindung von GTP fördern, aktivieren die ARF-Proteine. So wird der Austausch von hoch affin gebundenem GDP gegen GTP zur Aktivierung der ADP-Ribosylierungsfaktoren (ARF's) benötigt (Bourne et al., *Nature* 349 (1991), 117-127). Die Interaktion von Guaninnukleotidaustauschfaktoren (GEF's) mit dem ARF/GDP-Komplex erniedrigt die Affinität für GDP und erleichtert so dessen Dissoziation (Jackson. und Casanova, *Trends Cell. Biol.* 10 (2000), 60-67). Danach bindet GTP an die freie Nukleotidbindungsstelle des ARF/GEF-Komplexes, wodurch eine Konformationsänderung induziert wird, die zur Dissoziation des GEF's führt und den ARF/GTP-Komplex aktiviert (Peyroche et al., *Mol. Cell* 3 (1999), 275-285).

Die Inaktivierung der ARF-Proteine erfolgt durch die Hydrolyse des gebundenen GTP zu GDP, die von GTPase-aktivierenden Proteinen (GAPs) beschleunigt wird. Eine schematische Darstellung dieses Aktivierungs-/Deaktivierungszyklus ist in Fig. 1 dargestellt. ARF-GEF's können in zwei Familien unterteilt werden. Die großen oder hochmolekularen Guaninnukleotid-Austauschfaktoren (ARF-GEF's) mit einem Molekulargewicht über 100 kDa, unter anderem das Sec7 Protein aus der Hefe, Gea1, Gea2, BIG1 oder BIG2 zeichnen sich durch ihre charakteristische Sensitivität gegenüber dem niedermolekularen, organischen Inhibitor Brefeldin A aus. Brefeldin A bindet an den trimeren Intermediatkomplex von ARF, GDP und den großen ARF-GEF's, wodurch dieser stabilisiert wird. Dadurch wird der Austausch von GDP gegen GTP inhibiert und die Aktivierung der ARF-Proteine verhindert. Die großen ARF-GEF's spielen eine Rolle bei der Regulierung des endoplasmatischen Reticulums und des Golgiapparats. Die Zugabe von Brefeldin A führt zur Auflösung des Golgi und der Inhibition der Sekretion durch die Zellen.

Demzufolge hat sich Brefeldin A als nützliche Substanz zur Untersuchung der Funktion der großen GEF's in vitro und in vivo erwiesen

Die zweite Gruppe, zu der Cytohesin-1, Cytohesin-2 (ARNO), Cytohesin-3 (GRP-1/ARNO3) und Cytohesin-4 gehören, besitzt ein Molekulargewicht von ca. 50 kDa und wird nicht durch Brefeldin A inhibiert. Die kleinen ARF-GEF's sind hauptsächlich bei regulativen Vorgängen an dem endosomalen Kompartiment und an der Zytosplasmamembran beteiligt. Die ARF-GEF-Familie wurde unter anderem von Jackson und Casanova (Trends Cell. Biol. 10 (2000), 60-67) beschrieben und in Fig. 2 in einer Übersicht dargestellt (nach Donaldson und Jackson, Curr. Opin. Struct. Biol. 12 (2000), 475-482).. Ein gemeinsames Merkmal der ARF-GEF's ist ihre zentrale Sec7-Domäne; die weitgehend verantwortlich für die Katalyse des Guaninnukleotidaustauschs und die Sensitivität der großen GEF's gegenüber Brefeldin A ist.

Die kleinen ARF-GEF's sind impliziert in Signaltransduktionsprozessen, die über PI 3-Kinasen vermittelt werden (Karllund et al., Science 275 (1997), 1927-1930). Ferner sind sie beteiligt an der Reorganisation des Aktinzytoskeletts (Frank et al., Mol. Biol. Cell. 9 (1998), 3133-3146) und der Aktivierung von Integrinen (Geiger et al., EMBO J. 16 (2000), 3525-2536). Für die kleinen ARF-GEF's wurden bislang keine funktionellen Modulatoren oder Inhibitoren beschrieben, welche die direkte Untersuchung der Proteine in vitro und in Zellen ermöglichen. Daher wurden bislang die meisten Ergebnisse über ihre biologische Funktion durch Mutationsanalyse und die Expression/Überexpression der Proteine oder einzelner ihrer Domänen in Zellkultur gewonnen. Alle bislang identifizierten kleinen ARF-GEF's enthalten neben der SEC7-Domäne eine PH-(„plecstrin homology“)-Domäne, die die Lokalisation an Membranen durch Interaktion mit Polyphosphoinositiden steuern kann. Daneben wird auch eine CC-(„coiled coil“)-Domäne gefunden, die vermutlich die Interaktion mit anderen Proteinen vermittelt (vgl. Fig. 2 nach Donaldson und Jackson, Curr. Opin. Struct. Biol. 12 (2000), 475-482)

Der vorliegenden Erfindung liegt die Aufgabe zugrunde, einen Modulator für die Aktivität eines Guaninnukleotid-Austauschfaktors (ARF-GEF) für ARF-Proteine, insbesondere eines kleinen Guaninnukleotid-Austauschfaktors für ARF-Proteine bereitzustellen. Des weiteren liegt der Erfindung die Aufgabe zugrunde, einen Modulator für die GDP/GTP- Austauschfunktion eines Guaninnukleotid-Austauschfaktors, insbesondere eines kleinen Guaninnukleotid-Austauschfaktors bereitzustellen. Schließlich ist es eine weitere Aufgabe der vorliegenden Erfindung, ein Mittel bereitzustellen und Verfahren zur Herstellung derartiger Mittel, welches in den Prozess der durch Integrine vom Typ β -2 vermittelten Adhäsion von Immunzellen, insbesondere Leukozyten eingreift und somit ein Mittel darstellt, das bei der Therapie und Diagnose von Krankheiten, bei denen dieser Prozess beteiligt ist, eingreifen kann.

Erfindungsgemäß wird die Aufgabe gelöst durch eine Nukleinsäure, insbesondere eine isolierte Nukleinsäure, die in der Lage ist an einen Guaninnukleotid-Austauschfaktor für ADP-Ribosylierungsfaktoren zu binden und deren Derivate.

In einem zweiten Aspekt wird die Aufgabe gelöst durch eine Nukleinsäure, die in der Lage ist an einen Guaninnukleotid-Austauschfaktor für ADP-Ribosylierungsfaktoren zu binden, wobei die Nukleinsäure eine Sequenz umfaßt, die ausgewählt ist aus der Gruppe, die SEQ ID No. 1, SEQ ID No. 2, SEQ ID No. 3, SEQ ID No. 4, SEQ ID No. 5, SEQ ID No. 6, SEQ ID No. 7, SEQ ID No. 8, SEQ ID No. 9, SEQ ID No. 10, SEQ ID No. 18, SEQ ID No. 19, SEQ ID No. 20, SEQ ID No. 21, SEQ ID No. 22, SEQ ID No. 23, SEQ ID No. 24, SEQ ID No. 25, SEQ ID No. 26, SEQ ID No. 27, SEQ ID No. 28, SEQ ID No. 29, SEQ ID No. 30, SEQ ID No. 31, SEQ ID No. 32, SEQ ID No. 33, SEQ ID No. 34, SEQ ID No. 35, SEQ ID No. 36, SEQ ID No. 37, SEQ ID No. 38 und SEQ ID No. 39 sowie deren jeweilige Derivate umfaßt.

In einer Ausführungsform der erfindungsgemäßen Nukleinsäuren ist vorgesehen, dass die Derivate der Nukleinsäure wenigstens eine modifizierte Verbindungsgruppe, bevorzugterweise wenigstens eine modifizierte Verbindungsgruppe im Zuckerphosphatrückgrat und/oder wenigstens einen modifizierten Zuckerrest und/oder wenigstens eine modifizierte Base oder eine oder mehrere Kombinationen davon umfaßt.

In einer bevorzugten Ausführungsform der erfindungsgemäßen Nukleinsäuren ist vorgesehen, dass die modifizierte Base ausgewählt ist aus der Gruppe, die 5- Fluoruracil, 5-Bromuracil, 5-Chloruracil, 5-Ioduracil, Hypoxanthin, Xanthin, Ethenoadenosin, 4-Acetylcytosin, 5-(Carboxyhydroxymethyl)uracil, 5-Carboxymethylaminomehtyl-2-thio-uridin, 5- Carboxymethylaminomethyluracil, Dihydrouracil, β -D-Galactosylqueosin, Inosin, N6-Isopentenyladenin, 1-Methyladenin, 1- Methylpseudouracil, 1-Methylguanin, 1-Methylinosin, 2,2-Dimethylguanin, 2-Methyladenin, 2-Ethylguanin, 3-Methylcytosin, 5-Methylcytosin, N6-Methyladenin, 7-Methylguanin, 5-Methylaminomethyluracil, 5-Methoxyaminomethyl-2-thiouracil, β -D-Mannosylqueosin, 5'-Methoxycarbonylmethyluracil, 5-Methoxyuracil, 2-Methylthio-N6-Isopentenyladenin, Uracil-5-oxyesseigsäuremethylester, Uracil-5-oxyessigsäure, Pseudouracil, Queosin, 3-Thiacytosin, 5-Methyl-2-thiouracil, 2-Thiouracil, 4-Thiouracil, 5-Methyluracil, Uracil-5-oxyessigsäuremethylester, Uracil-5-oxyessigsäure, 3(3-Amino-3-N-2-carboxypropyl)Uracil und 2,6-Diaminopurin.

In einer weiteren Ausführungsform der erfindungsgemäßen Nukleinsäuren ist vorgesehen, dass diese mindestens eine Modifikation oder Markierung am 5'- und/oder 3'-Ende, wobei bevorzugterweise die Modifikation und/oder die Markierung ausgewählt ist aus der Gruppe, die die Biotingruppe; die Digoxygeningruppe; Fluoreszenzfarbstoffe, insbesondere Fluorescein und Rhodamin; Psoralen; Thiolgruppe(n), Aminogruppe(n), Ethylenglykolgruppe(n)- oder Cholesterylgruppe(n) enthält.

In einer noch weiteren Ausführungsform der erfindungsgemäßen Nukleinsäuren ist vorgesehen, dass die modifizierte Verbindungsgruppe ausgewählt ist aus der Gruppe, die Phosphomono- oder Phosphodithioate, Alkylphosphonate, Arylphosphonate, Phosphoroamidate, Phosphatetriester, bevorzugterweise P(O)-Alkylderivate; Verbindungsgruppen, in denen Sauerstoffatome in der durch die

Phosphatgruppe gebildet Brücke zwischen den Zuckern durch andere Bindungen ersetzt werden, bevorzugterweise NH-, CH₂- oder S-P-Verbindungen, bevorzugterweise 3'-NHP(O)-(O)O-5'phosphoramidate; Dephosphointernukleotidverbindungen, bevorzugterweise Acetamidat-, Carbamatverbindungen oder Peptidnukleinsäuren (PNA) umfaßt.

In einer Ausführungsform der erfindungsgemäßen Nukleinsäuren ist vorgesehen, dass der modifizierte Zuckerrest ausgewählt ist aus der Gruppe, die 2'-Azido-2'-Deoxy-, 2'-Amino-2'-Deoxy-, 2'-Fluoro-2'-Deoxy-, 2'-Chloro-2'-Deoxy, 2'-O-Methyl, 2'-O-Allyl-, 2'-C-Fluoromethyl-Gruppen und/oder Modifikationen umfaßt.

In einer Ausführungsform der erfindungsgemäßen Nukleinsäuren ist vorgesehen, dass der Guaninnukleotidaustauschfaktor zur Gruppe der kleinen Guaninnukleotidaustauschfaktoren für ARF-Proteine gehört, insbesondere zur Gruppe der Guaninnukleotidaustauschfaktoren, deren Molekulargewicht etwa 50 kDa oder weniger beträgt.

In einer noch weiteren Ausführungsform der erfindungsgemäßen Nukleinsäuren ist vorgesehen, der Guaninnukleotidaustauschfaktor nicht durch Brefeldin A inhibiert wird.

In einer bevorzugten Ausführungsform der erfindungsgemäßen Nukleinsäuren ist vorgesehen, dass der Guaninnukleotidaustauschfaktor Cytohesin-1 oder Cytohesin-2 und insbesondere die Sec7-Domäne von Cytohesin-1 oder Cytohesin-2 ist.

In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform der erfindungsgemäßen Nukleinsäuren ist vorgesehen, dass der Guaninnukleotidaustauschfaktor die Sec7-Domäne ist.

In einer noch weiteren Ausführungsform der erfindungsgemäßen Nukleinsäuren ist vorgesehen, dass die Nukleinsäure eine solche ist, die ausgewählt ist aus der Gruppe, die DNA, RNA, Polynukleotide, Oligonukleotide, Aptamer, Aptazyme und Intramere umfaßt.

In einem dritten Aspekt wird die Aufgabe gelöst durch einen Vektor umfassend eine erfindungsgemäße Nukleinsäure.

In einer Ausführungsform ist vorgesehen, dass der Vektor ein Expressionsvektor ist.

In einem vierten Aspekt betrifft die Erfindung eine Zelle umfassend eine erfindungsgemäße Nukleinsäure und/oder einen erfindungsgemäßen Vektor.

In einer Ausführungsform ist vorgesehen, dass die Zelle eine eukaryontische Zelle, bevorzugterweise eine tierische Zelle und ganz bevorzugt eine Zelle eines Säugetiers ist.

In einer weiteren Ausführungsform ist vorgesehen, dass die Zelle ausgewählt ist aus der Gruppe, die *Saccharomyces cerevisiae* und *C. elegans* umfasst.

In einer noch weiteren Ausführungsform der erfindungsgemäßen Zelle ist vorgesehen, dass das Säugetier ausgewählt ist aus der Gruppe, die Mäuse, Ratten, Kaninchen, Hunde, Schweine, Affen und Menschen umfasst.

In einem fünften Aspekt betrifft die Erfindung ein Tier, bevorzugterweise ein transgenes Tier, das mindestens eine erfindungsgemäße Zelle umfasst.

In einer Ausführungsform ist vorgesehen, dass das Tier ausgewählt ist aus der Gruppe, die Nematoden, Fische, Mäuse, Ratten, Kaninchen, Hunde, Schweine und Affen umfasst.

In einem sechsten Aspekt betrifft die Erfindung die Verwendung einer erfindungsgemäßen Nukleinsäure zur Herstellung eines Medikamentes.

In einer Ausführungsform ist, dass das Medikament für die Behandlung von Erkrankungen ist, die ausgewählt sind aus der Gruppe, die Metastasierung von Lymphomen oder Melanomen, Autoimmunerkrankungen, Abstoßungsreaktionen, akute und chronische Entzündungen, Reperfusionsschäden, Transplantationserkrankungen, insbesondere Abstoßungsreaktionen bei Organtransplantationen und graft-vs-host-Erkrankungen umfasst.

In einer Ausführungsform der erfindungsgemäßen Nukleinsäuren ist vorgesehen, dass das Medikament die durch β -2 – Integrine vermittelte Adhäsion von Immunzellen beeinflusst.

In einem siebten Aspekt betrifft die Erfindung die Verwendung einer erfindungsgemäßen Nukleinsäure und/oder eines erfindungsgemäßen Vektors in der Gentherapie.

In einem achten Aspekt betrifft die Erfindung die Verwendung einer erfindungsgemäßen Nukleinsäure zum Nachweis eines Guaninnukleotidaustauschfaktors

In einem neunten Aspekt betrifft die Erfindung die Verwendung einer erfindungsgemäßen Nukleinsäure zur Komplexbildung mit einem Guaninnukleotidaustauschfaktor.

In einem zehnten Aspekt betrifft die Erfindung eine Zusammensetzung, insbesondere pharmazeutische Zusammensetzung, umfassend eine erfindungsgemäße Nukleinsäure, einen erfindungsgemäßen Vektor

und/oder eine erfindungsgemäße Zelle zusammen mit einem geeigneten Trägermaterial, insbesondere einem pharmazeutisch akzeptablen Träger.

In einem elften Aspekt betrifft die Erfindung einen Inhibitor für einen Guaninnukleotidaustauschfaktor, wobei der Guaninnukleotidaustauschfaktor zur Gruppe der kleinen Guaninnukleotidaustauschfaktoren für ARF-Proteine gehört, insbesondere zur Gruppe der Guaninnukleotidaustauschfaktoren, deren Molekulargewicht etwa 50 kDa oder weniger beträgt.

In einer Ausführungsform ist vorgesehen, dass der Guaninnukleotidaustauschfaktor nicht durch Brefeldin A inhibiert wird.

In einer weiteren Ausführungsform ist vorgesehen, dass der Inhibitor eine erfindungsgemäße Nukleinsäure und/oder einen erfindungsgemäßen Vektor umfaßt.

In einem zwölften Aspekt betrifft die Erfindung ein Verfahren zum Screenen von Verbindungen, die die Wechselwirkung zwischen einem Guaninnukleotid-Austauschfaktor und einer erfindungsgemäßen Nukleinsäure inhibieren, insbesondere durch ein Verfahren, das mit Hochdurchsatzverfahren kompatibel ist und durch folgende Schritte gekennzeichnet ist:

- a) Bereitstellen des Guaninnukleotid-Austauschfaktors und der Nukleinsäure
- b) optional Bestimmen, ob eine Wechselwirkung zwischen dem Guaninnukleotid-Austauschfaktor und dem β -2-Integrin erfolgt,
- c) Hinzufügen einer Kandidaten-Verbindung, und
- d) Bestimmen, ob eine Wechselwirkung zwischen dem Guaninnukleotid-Austauschfaktor und der Nukleinsäure, bevorzugterweise durch die Kandidaten-Verbindung, inhibiert wird.

In einer Ausführungsform ist vorgesehen, dass als weiterer Schritt vorgesehen ist Bestimmen, ob die identifizierte Verbindung die Guaninnukleotid-Austauschfunktion des Guaninnukleotid-Austauschfaktors für ein monomeres G-Protein inhibiert.

In einer weiteren Ausführungsform ist vorgesehen, dass als weiterer Schritt vorgesehen ist Bestimmen, ob die Interaktion eines Guaninnukleotid-Austauschfaktors mit einem Integrin, bevorzugterweise die Wechselwirkung zwischen der Sec-7-Domäne von Cytohesin-1 und der β -2-Integrinuntereinheit inhibiert wird.

In einer alternativen Ausführungsform ist vorgesehen, dass als weiterer Schritt vorgesehen ist Bestimmen, ob die Interaktion der PH-Domäne mit ihren natürlichen Liganden inhibiert wird, bevorzugterweise die Interaktion der PH-Domäne von Cytohesin-1 mit Phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphat inhibiert wird.

In einer weiteren Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens ist vorgesehen, dass die Kandidaten-Substanz zur Herstellung eines Medikamentes verwendet wird.

In einer bevorzugten Ausführungsform ist, dass das Medikament für die Behandlung von Erkrankungen ist, die ausgewählt sind aus der Gruppe, die Metastasierung von Lymphomen oder Melanomen, Autoimmunerkrankungen, Abstoßungsreaktionen, akute und chronische Entzündungen, Reperfusionsschäden, Transplantationserkrankungen, insbesondere Abstoßungsreaktionen bei Organtransplantationen und graft-vs-host-Erkrankungen umfasst

In einer weiteren Ausführungsform ist vorgesehen, dass die erfindungsgemäße Nukleinsäure, der Guaninnukleotid-Austauschfaktor oder beide mit Fluoreszenzfarbstoffen markiert sind und die Inhibition der Wechselwirkung zwischen der Nukleinsäure und dem Guaninnukleotid-Austauschfaktor zu einer meßbaren Veränderung des Fluoreszenzsignals führt.

In einer noch weiteren Ausführungsform ist vorgesehen, dass die Nukleinsäure oder der Guaninnukleotid-Austauschfaktor als Wechselwirkungspartner mit einer fluoreszenzlöschenenden Gruppe (Quencher), der jeweils andere Wechselwirkungspartner mit einer fluorophoren Gruppe (Donor) markiert ist, wobei die Wechselwirkung zwischen beiden Wechselwirkungspartnern zur Löschung der Fluoreszenzemission des Donors führt, und die Inhibition der Wechselwirkung zur Freisetzung der Fluoreszenz des Donors führt.

In einer Ausführungsform ist vorgesehen, dass die Nukleinsäure ein Aptazym ist und die Inhibition der Bindung des Guaninnukleotid-Austauschfaktors an das Aptazym durch eine Veränderung der katalytischen Aktivität des Aptazym gemessen werden kann.

In einer noch weiteren Ausführungsform ist, dass die Wechselwirkung zwischen den Wechselwirkungspartner erfindungsgemäße Nukleinsäure und Guaninnukleotid-Austauschfaktor mittels Detektionsverfahren wie enzymbasierenden Assays surface plasmon resonance (SRP), fluorescence activated cell sorting FACS, fiberoptische Microarray Sensoren, Kapillarelektrophorese, quartz crystal microbalance (QCM) oder radioaktiven Messverfahren erfolgt.

In einem dreizehnten Aspekt betrifft die Erfindung die Verwendung eines Guaninnukleotid-Austauschfaktors als Zielmolekül im Rahmen eines in vitro Selektions-Verfahrens.

In einem vierzehnten Aspekt betrifft die Erfindung ein Verfahren zur Identifizierung und Isolierung von Nukleinsäuren, die in der Lage sind, an ein Zielmolekül zu binden, das durch die folgenden Schritte gekennzeichnet ist:

- Inkubieren des Zielmoleküls oder eines Teils davon mit einer Vielzahl von Nukleinsäuren, bevorzugterweise einer Nukleinsäurebibliothek, wobei die Nukleinsäuren verschiedene Sequenzen aufweisen.
- Selektieren und Isolieren jener Nukleinsäuren, die in der Lage sind, an das Zielmolekül oder einen Teil davon zu binden,

-optional Amplifizieren der isolierten Nukleinsäuren and Wiedernholen der ersten beiden Schritte; und

- optional Bestimmen der Sequenz und/oder Bindungsspezifität der isolierten Nukleinsäuren,

wobei, dass das Zielmolekül ein Guaninnukleotid-Austauschfaktor, bevorzugterweise ein solcher für ARF ist.

In einem fünfzehnten Aspekt betrifft die Erfindung die Verwendung einer erfindungsgemäßen Nukleinsäure, wobei die Nukleinsäure bevorzugterweise in einem Komplex mit einem Guaninnukleotid-Austauschfaktor vorliegt, zum rationalen Design von Verbindungen. Bei den Verbindungen handelt es sich bevorzugterweise um Inhibitoren und bevorzugterweise um niedermolekularen Inhibitoren. Im Zusammenhang damit dient die Struktur der erfindungsgemäßen Nukleinsäuren als Leitstruktur für niedermolekulare oder kleine Verbindungen, die wie der erfindungsgemäßen Nukleinsäuren inhibierend wirken (können).

Bei dem erfindungsgemäßen Verfahren zum Screenen von Verbindungen, die die Wechselwirkung zwischen einem Guaninnukleotidaustauschfaktor und einer erfindungsgemäßen Nukleinsäure inhibieren, kann vorgesehen sein, dass die Kandidaten-Verbindung eine beliebige Verbindung sein, die beispielsweise aus einer Verbindungsbibliothek stammt, deren Fähigkeit getestet werden soll, ob sie die besagte Wechselwirkung zu beeinflussen, insbesondere zu inhibieren in der Lage ist.

Bei dem erfindungsgemäßen Verfahren zum Screenen von Verbindungen, die die Wechselwirkung zwischen einem Guaninnukleotidaustauschfaktor und einer erfindungsgemäßen Nukleinsäure inhibieren, kann das Detektionsverfahren auf enzymbasierenden Assays analog zu auf Antikörper basierenden ELISAs beruhen.

Bei der erfindungsgemäßen Verwendung eines Guaninnukleotid-Austauschfaktors als Zielmolekül im Rahmen eines *in vitro* Selektions-Verfahrens ist vorgesehen, dass der ARF-GEF ein jeder ARF-Gef ist, an den auch die erfindungsgemäßen Nukleinsäuren binden.

Der Erfindung liegt die überraschende Erkenntnis zu Grunde, dass Nukleinsäuren oder Nukleinsäureliganden gegen die kleinen ARF-GEF-Proteine erzeugt werden können, die, im Komplex mit